Aus der Klinik und Poliklinik für kranke Kinder
der Universität Breslau

Ueber den Einfluß verschiedener Zusätze auf den Ablauf der Haemolyse

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der Medizin und Chirurgie
der hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Barbara Kramer
Arzt

Breslau 1926

Druck von J. H. Burmeister, Liegnitz, Steinmarkt 5.

Gedruckt mit Genehmigung der Hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Breslau.

Berichterstatter: Professor Dr. Stolte.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Der Gedanke, anämischen Kranken das Blut von Gesunden zuzuführen, liegt schon viele Jahrzehnte zurück. Er ist immer wieder verlassen worden und immer wieder von neuem aufgenommen. In den letzten Jahren sind die intravenösen Bluttransfusionen weiter ausgebaut worden, und doch wird von vielen Mißerfolgen berichtet. Der Grund liegt in der heute allgemein bekannten Erscheinung der Haemolyse. Die zahlreiche Literatur, die darüber entstanden ist, beweist, daß die Frage der Haemolyse für den Kliniker von großer praktischer Bedeutung ist, und darum sind alle Mittel zu versuchen, um diese Erscheinung zu unterdrücken. Seit langem sind deshalb die Bestrebungen darauf gerichtet, das Wesen dieses Vorgangs zu ergründen und den Angriffspunkt zu finden. Die meisten Forscher legen die Ehrlichsche Seitenkettentheorie zu Grunde, andere hielten es für einen proteolytischen Vorgang, oder sie sahen die Ursache in einer Lösung der Lipoide, beziehungsweise der Erythrozytenmembranen u. a. m. Eine endgültige Lösung hat das Problem noch nicht gefunden. Man versucht deshalb, mittels biologischer Vorproben und durch Agglutinations-Untersuchungen die ungeeigneten Blutsorten von der Verwendung auszuschließen. Einen anderen Weg schlagen die nachstehenden Versuche ein. Es sollen die hemmenden beziehungsweise auch beschleunigenden Einflüsse auf den Vorgang der Haemolyse in vitro untersucht werden.

Schon der französischen Schule Henri und Mioni fiel es auf, daß die Haemolyse weitgehend von der Art des zugesetzten Serums abhängig war. Und zwar zeigte sich der Unterschied hauptsächlich in der Stärke des Haemolysegrades. Ueber den zeitlichen Verlauf der Reaktion ist aus den Arbeiten nichts zu ersehen. Auch Mioni bemerkte eine individuell verschiedene haemolytische Kraft der einzelnen Sera. Interessanterweise fand sich auch, daß ein gegen gewisse Blutkörperchen nicht haemolytisch wirkendes Serum die Auflösung dieser Blutkörperchen durch ein sonst haemolytisch wirkendes Serum verhinderte. — Mischte man hingegen zwei im gleichen Sinne wirkende Sera, so wurde eine erheblich stärkere haemolytische Wirkung beobachtet, als die jedes einzelnen Serums allein. Die Vermehrung der haemolytischen Aktivität, die durch Mischung dieser beiden Sera hervorgerufen wird, ist einander relativ proportional. Dieses Gesetz ähnelt dem Gesetz der Aktivität der Colloidale zu einander.

Es ist auch sehr bald erkannt worden, daß die Menge der Blutkörperchen einen beachtenswerten Einfluß auf das quantitative Resultat der Haemolyse ausübt. Mioni hat in mehreren Versuchen gezeigt, daß bei größeren Mengen Erythrozyten eine stärkere Haemolyse auftritt. Daraus schloß er, daß die Blutkörperchen nicht alle die gleiche Resistenz hätten. Henri kam bei dem gleichen Versuch mit etwas anderer Anordnung zu einem anderen Ergebnis. Er beobachtete die stärkste Haemolyse bei den niedrigsten Konzentrationen der Blutkörperchen. Allerdings waren die Resultate nach längerer Beobachtungszeit entgegengesetzt. Die Begründung sucht er in der schnellen Adsorption des Haemolysins an die Erythrozyten.

Dies sei ein kurzer Ueberblick der in dieses Gebiet einschlägigen Literatur.

Aus diesen Gesichtspunkten heraus ergaben sich mehrere Fragestellungen. Die widersprechenden Resultate Henris und Mionis waren zu klären. Es lag nahe, daran zu denken, daß bei einem Ueberangebot von Erythrozyten, die auf das einzelne Körperchen entfallende Menge Haemolysin nicht mehr zur Lösung ausreichte (was ja nach der Ehrlichschen Theorie ohne weiteres möglich wäre). Andererseits war hier eine Entscheidung über die Annahme von Arrhenius zu fällen, der ein chemisches Gleichgewicht vermutete. Landsteiner lehnt dieses Gleichgewicht allerdings ab.

Der Versuch gestaltete sich folgendermaßen:

Es werden — wie bei fast allen folgenden Anordnungen — Hammelerythrozyten und Schweineserum verwendet. Die Erythrozyten sind durch langes Zentrifugieren gewonnen und durch ausgiebiges Waschen mit Normosal von allen Ballaststoffen befreit, die etwa fördernd auf die Haemolyse wirken könnten. Das Serum erhält man ebenfalls durch Zentrifugieren. Die Bestimmung des Haemoglobins wurde bei fast allen Versuchen durch das Spektrophotometer vorgenommen, und zwar wurde das Martin-Grünbaumsche verwendet, und nur in einer geringen Minderzahl wurde die Bestimmung mit dem gewöhnlichen Dubosq vorgenommen.

Einen ungefähren Ueberblick soll der Versuch I verschaffen.

Versuch I.

Eine Reihe von Röhrchen wird mit 4 bis 7,5 ccm Schweineserum beschickt und jeweils bis zu 8 ccm mit Hammelerythrozyten aufgefüllt. Nach zweistündlichem Stehen im Brutschrank bei 37° wurde die Haemolyse durch Zusatz von 2 ccm 6% Kochsalzlösung unterbrochen und das Gemisch zentrifugiert. Von dem Ueberstand werden 2 ccm mit 0,5% Phenollösung auf 25 ccm aufgefüllt nnd spektrophotometriert. Dabei zeigte

sich, daß die Haemolyse bis zum Zusatz von 1,0 ccm Erythrozyten ansteigt, während größere Mengen ein langsames Absinken zur Folge haben. Danach scheint ein Gleichgewicht einzutreten. Diese Beobachtung veranlaßte zur quantitativen Auswertung. Versuchsanordnung und Ausführung sind wie vorhin. Es werden aufgestellt:

1.	7,8	ccm	Serum	0,2 ccm	Erythrozyten
2.	7,6	„	„	0,4 „	„
3.	7,4	„	„	0,6 „	„
4.	7,2	„	„	0,8 „	„
5.	7,0	„	„	1,0 „	„
6.	6,5	„	„	1,5 „	„
7.	6,0	„	„	2,0 „	„
8.	5,0	„	„	3,0 „	„
9.	4,0	„	„	4,0 „	„

Dabei ergibt sich: völlige Auflösung der Blutkörperchen bei 1. und 2.

Geringer Bodensatz bereits bei 3., der zunehmend bis zu Röhrchen 9. zu verfolgen ist bei dementsprechend abnehmender Haemolyse.

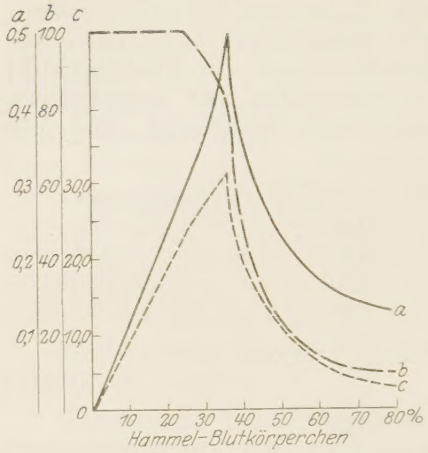
Die Errechnung der Haemoglobinmenge in der Lösung wird nach folgender Koenigscher Formel vorgenommen:

$$c = \frac{\log \operatorname{tg} \alpha_2 - \log \operatorname{tg} \alpha_1}{\varepsilon \, d.},$$

wobei tg α_2 die Ablesung der Vergleichsflüssigkeit (Serumverdünnung 2 : 25 mit physiologischer Kochsalzlösung) rechts, Versuchlösung links, α_1 bei umgekehrter Stellung angibt. c ist die Konzentration, ε = der Extinktionskoefficient und d = die Dicke der extinguierenden Schicht. Bei dieser Formel konnten, da alle Werte auf eine Einheit bezogen wurden, der Nenner unbestimmt bleiben, da immer dieselbe Schichtdicke verwandt wurde und ε sich bei der Division heraushob. Mit diesen Zahlen waren aber noch nicht die wirklichen Werte gegeben, da ja die gelöste Erythrozytenmenge eine Verdünnung des Serums bedeutete. Darum erfolgte eine Umrechnung nach der Formel:

$$\frac{x\,\alpha + b\,\beta}{x + b + K} = c\,\frac{1}{\gamma},$$

wobei x die haemolysierte Blutkörperchenmenge, b die aus den Versuchsbedingungen bekannte Serummenge, K den Kochsalzzusatz, α die Extinktion der reinen Blutemulsion, β des Serums darstellt, c aus der spektrophotometrischen Ablesung zu entnehmen ist, und γ den Verdünnungsgrad bedeutet. Die ausgerechneten Werte ergeben folgende Kurve:



Ihr Verlauf zeigt, daß hier absolut kein chemisches Gleichgewicht stattfindet, in dem Sinne, wie es Arrhenius vermutet

$$\frac{[a]\cdot[b]}{[c]} = \text{konst.};$$

das heißt also, daß das Produkt der Konzentrationen konstant wäre. Dies ist aber nicht der Fall; denn die Kurve ist typisch für das Adsorptionsgleichgewicht. Von hohen Erythrozyten-Konzentrationen ausgehend wächst die haemolysierende Kraft mit der Verminderung der Erythrozyten bis zu einem bestimmten Punkte, bis dann die Menge der Blutkörperchen nicht mehr ausreicht, um alles im Serum vorhandene Haemolysin zu verbrauchen. Ein III. Versuch, der zur Kontrolle unternommen wurde, ergab das gleiche Resultat.

Von Interesse war in diesem Zusammenhang, ob die restierenden Erythrozyten, die in einer solchen überkonzentrierten Haemoglobinlösung verwandt waren, eine erhöhte Löslichkeit gegenüber frischem Haemolysin aufwiesen. Dies war die Annahme Mionis, der eine verschiedene Resistenz der Blutkörperchen vermutete. Daher werden 3 ccm Serum mit 8 ccm Erythrozyten bei 37° der Haemolyse unterworfen. Nach Beendigung des Prozesses (Voruntersuchungen ergaben als Zeit dafür 20 Minuten) werden die Blutkörperchen vom Serum durch Zentrifugieren getrennt und 2 ccm der Erythrozyten mit 3 ccm frischem Serum erneut zum Versuch angesetzt. Dabei beträgt der Haemolysegrad im Kontrollversuch 33 % der zugesetzten Erythrozyten. Im Versuch selbst sind ebenfalls 33 % in Lösung gegangen. Also erleiden die restierenden Blutkörperchen aus der Haemolysemischung keine Veränderung ihrer Resistenz, beziehungsweise unterliegen nicht die resistenzschwächeren allein der Haemolyse.

Aus bisher unveröffentlichten Versuchen, die gemeinsam mit Dr. Klinke und Dr. Knauer angestellt wurden, ging hervor, daß der Stillstand des haemolytischen Prozesses, der als ein fermentativer Vorgang anzusehen ist, dadurch bedingt ist, daß das Ferment Haemolysin an die bei der Haemolyse entstehenden Bruchstücke adsorbiert wird. Der Gedanke lag nahe, daß der adsorbierende Faktor das freiwerdende Haemoglobin sei. Der nachstehende Versuch sollte das entscheiden:

Das Haemoglobin wird aus gewaschenen Erythrozyten dargestellt, die einer Kältehaemolyse unterworfen werden. Die Stromata werden abzentrifugiert und 1 ccm der Haemoglobin-

lösung einem Gemisch von 2 ccm Schweineserum und 2 ccm Hammelerythrozyten zugefügt. Zur Kontrolle läuft die gleiche Mischung ohne die Haemoglobinlösung. Als Standard wird eine 100 % Hb. Lösung in der Verdünnung 1 : 50 verwendet.

Versuch I.

Ablesung mit Hb. Lösung ergibt
18 : 25 = 100 : 140 = 70 % Hb.

Ablesung ohne Hb. Lösung ergibt
37 : 25 = 78 : 100 = 39 % Hb.

Im **Versuch II.** werden 3 ccm Serum mit 2 ccm Blutkörperchen und 2 ccm Haemoglobinlösung und ebenfalls zur Kontrolle das gleiche Gemisch ohne Hb. angesetzt. Der Standard ist diesmal in einer Verdünnung 2 : 50.

Ablesung mit Hb. Lösung ergibt
39 : 25 = 66 : 100 = 33 % Hb.

Ablesung ohne Hb. Lösung ergibt
19,5 : 25 = 100 : 129 = 64 % Hb.

Eine geringe Hemmung ist also zu beobachten, aber sie ist immerhin so unbedeutend, daß sie unberücksichtigt bleiben kann. Die Differenz beträgt ungefähr 2 %, während die zugesetzte Haemoglobinmenge erheblich größer war. Einen nennenswerten Einfluß hat mithin der in Lösung gehende Blutfarbstoff nicht auf den Ablauf des Prozesses, und es müssen daher andere Stoffe sein, die diese Adsorption bewirken. Bei der Betrachtung der Versuche Mionis fällt auf, daß noch niemand auf den Gedanken gekommen ist, daß das arteigene Serum ja am allerwenigsten haemolysiert; und deshalb wurde untersucht, wie Zusätze dieses Serums die Haemolyse beeinflussen. Sie führten zu folgendem interessanten Resultat:

In einem Reihenversuch werden Gemische hergestellt von 2 ccm Schweineserum und 0,5 ccm Hammelerythrozyten. Dazu wird in steigender Menge von 0,5—8,0 ccm arteigenes, also Hammelserum zugefüllt und 2 Stunden im Brutschrank bei 37° belassen. Wie in den vorigen Versuchen wird der abzentrifugierte Ueberstand mit 0,3 % Phenollösung verdünnt und spektrophotometrisch der Haemoglobingehalt bestimmt. Das Ergebnis zeigte eine vollständige Unterdrückung der Haemolyse in allen Röhrchen auch bereits bei dem geringen Zusatz von 0,5 ccm arteigenen Serums. Bei der Wiederholung des Versuches wurde das gleiche Resultat erhalten. Wie diese beachtenswerte Erscheinung zu deuten ist, läßt sich sehr schwer sagen, vielleicht ist allein die Milieuänderung die Ursache hierfür, vielleicht enthält das zu den Erythrozyten passende Serum Stoffe, die das Haemolysin binden und dadurch den Blutaustritt verhindern.

In den nächsten Untersuchungen wurde daran gegangen, die Wirkung des Zusatzes einzelner Blut- beziehungsweise Serumbestandteile zu studieren. Die wichtigsten Stoffe sind in

dieser Fragestellung das Cholesterin und Lecithin, über deren Verhalten bereits eingehende Forschungen angestellt worden sind. Nolt verwies darauf, daß die Wirkung der Saponine nur bei Anwesenheit von Lecithin stattfinde. Auch Roffos Versuche erbrachten einen deutlichen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Haemolyse und Cholesterin. Von großer Wichtigkeit sind die komplizierten Versuche Pascuccis, der Seidenmembranen mit verschieden zusammengesetzten Cholesterin-Lecithingemischen imprägnierte und dabei den Angriffspunkt der zugesetzten Saponine nachweisen konnte. Als Wichtigstes ist zu vermerken, daß es Landsteiner gelang, mit dem Aetherextrakt aus den Erythrozyten einen hemmenden Einfluß auf die Haemolyse auszuüben, nicht aber mit den Stoffen, nämlich mit einem Gemisch aus Cholesterin und Lecithin in der Zusammensetzung, wie sie in den Stromata vorkommen.

Dieser eigenartige Befund ließ daran denken, daß der Zustand der betreffenden Stoffe ein wichtiger Faktor ist für die Hemmung der Haemolyse, die hier wohl gleichbedeutend ist mit einer Adsorption oder Bindung des Haemoglobins. Andererseits bestand auch die Möglichkeit, daß bestimmte chemische, wohl sehr kompliziert gebaute Veresterungen oder ähnliche Kombinationen der Angriffspunkt wären. Dieser Gedanke war im Rahmen der Arbeit nicht zu klären und erforderte wohl auch umfassende Studien. Die andere Möglichkeit sollte durch Versuche geklärt werden, die analog denen von Landsteiner aufgebaut waren, und bei denen die Sole der betreffenden Lipoide verwandt wurden.

Die Darstellung des Lecithinsols wurde durch Aufschwemmung von Lecithin in Normosal ausgeführt, das eine halbe Stunde im Wasserbade bei 37° verblieb.

Das Cholesterinsol wurde auf folgende Weise erhalten:

Cholesterin wird in siedendem Alkohol aufgelöst und langsam portionsweise in kochende physiologische Kochsalzlösung eingebracht. Durch dreistündiges Erhitzen wird der Alkohol abgedampft und von den ungelösten Bestandteilen abfiltriert. Eine trübe kolloidale Lösung resultiert, mit welcher die Bestimmungen vorgenommen werden.

Zur Verwendung gelangt ferner das Helpin, eine von Magat hergestellte Emulsion von Lecithin und Glyzerin, zu der ein Elektrolytensystem hinzugefügt ist.

Der Versuch wird folgendermaßen angesetzt: Unter dauerndem Rühren im Wasserbad bei 37° werden die Serumportionen mit dem Sol versetzt und danach die Blutkörperchen zugefügt. Es laufen zwei Versuchsreihen und eine Kontrolle, weil eine erste Entnahme nach 20 Minuten, eine zweite nach zwei Stunden einen Einblick in die Geschwindigkeit der Reaktion geben sollte.

Es werden angesetzt:

3	ccm	Serum	1/2	ccm	Lecithinsol	2	ccm Erythroz.
3	„	„	1/2	„	Cholesterinsol	2	„ „
3	„	„	1/2	„	Helpin	2	„ „
3	„	„				2	„ „

Die erste Entnahme nach 20 Minuten aus der ersten Reihe:

Lösung Lecithinsol — 28 % Haemoglobin
„ Cholesterinsol — 23 % „
„ Helpinsol — 18 % „

nach weiteren zwei Stunden aus der zweiten Reihe:

Lösung Lecithinsol — 34 % Haemoglobin
„ Cholesterinsol — 32 % „
„ Helpinsol — 35 % „

Der Kontrollversuch ergab 35 % Haemoglobin.

Der Ablauf ist zwar deutlich verzögert, da er normalerweise nach 20 Minuten beendet ist, aber nicht gehemmt. So ist also diese Frage auch beantwortet. Es ist nicht allein der kolloidale Zustand, in dem die Wirkung des Haemolysins stattfindet, sondern es müssen auch die erwähnten Verbindungen einige Wichtigkeit für den Ablauf der Reaktion haben. — Die Nachprüfung der Versuche Landsteiners gab das erwartete Resultat. Der Versuch gestaltet sich auf folgende Weise: durch Wasserhaemolyse wird das Stroma vom Haemoglobin getrennt und durch Zentrifugieren die Stromasubstanz erhalten, die mit Aether extrahiert wird. Der Extrakt wird abgedampft und der Rückstand mit Normosal aufgeschüttelt. Von diesem Stromaextrakt wird 1/2 ccm einem Gemisch von 3 ccm Serum und 2 ccm Erythrozyten zugesetzt. Zur Kontrolle läuft das Blutgemisch ohne Stroma. Das Ergebnis dieser Reaktion zeigte im Versuch einen Haemoglobingehalt von 33 %, während in der Kontrolle sich nur 15 % Hb. nachweisen ließen. Hierbei tritt also eine deutliche Hemmung ein, die wohl so bedingt ist, wie oben angegeben.

Die nächste Aufgabe war es, die Einwirkung der Elektrolyten zu untersuchen, die — wie aus der Literatur ersichtlich ist — eine große Rolle beim Ablauf der Haemolyse spielen. Walbum hat nachgewiesen, daß eine bestimmte H^+-Konzentration zur optimalen Leistung für jedes Haemolytika von Wichtigkeit ist. — In einer zusammenfassenden Arbeit hat Eisler gezeigt, daß durch Erhöhung der Salzkonzentration eine Hemmung der Haemolyse erfolgt. Er war der Meinung, daß diese Hemmung durch eine Beziehung zwischen der Viskosität und der Salzkonzentration bedingt ist. Nun haben seine Versuche den Nachteil, daß das Serummilieu fast völlig ausgeschaltet ist, dadurch daß Eisler in fast reinen Salzlösungen arbeitet.

Bei den nachstehenden Versuchen wurde deshalb nach Möglichkeit der physiologische Zustand bewahrt und die Erhöhung der Salzkonzentrationen durch Zusätze von hoch-

konzentrierten Lösungen erhalten. Es werden hauptsächlich die im Serum normalerweise vorkommenden Salze berücksichtigt. Mit analytisch gewogenen Salzmengen bekommt jede Lösung ungefähr den dreifachen physiologischen osmotischen Druck. — Für die Versuchsanordnung werden absteigende Verdünnungen mit destilliertem Wasser hergestellt und 5 ccm davon mit 0,9 ccm Schweineserum gründlich durchgeschüttelt; danach werden 0,1 ccm Hammelerythrozyten hinzugefügt. Das Ganze wird drei Stunden im Brutschrank bei 38° belassen. Mit Hilfe der Landolt-Börnsteinschen Tabellen wird dann von jeder Salzlösung durch Interpolation die Gefrierpunktserniedrigung berechnet. Der osmotische Druck der Lösung, bei welchem zum ersten Male keine Haemolyse statt hat, wird nach der Formel bestimmt

$$\frac{1{,}0 \cdot 0{,}56 + b \cdot \alpha}{(1 + a + b) = 4} = \Delta \text{ der Gesamtlösung.}$$

Dabei ist a = die Menge Wasser, b = die Menge Salzlösung, α = die Gefrierpunktserniedrigung der betreffenden Salzlösung.

Dabei ergab sich das Resultat für

Ammoniumchlorid	oberhalb	1,05°		
Natriumchlorid	zwischen	0,95°	und	1,02°
Kaliumchlorid	„	0,80°	„	0,90°
Calciumchlorid	unter	0,48°		
Magnesiumchlorid	zwischen	0,96°	„	1,02°
Natriumbikarbonat	„	0,92°	„	0,98°
Natriumkarbonat	über	1,04°		
Natriummonophosphat	zwischen	0,86°	„	0,95°
Kaliumdiphosphat	„	0,59°	„	0,63°
Kaliumsulfat	„	0,78°	„	0,88°.

Diese Ergebnisse stimmen also im Prinzip mit denen Eislers überein.

Die Haemolyse ist nicht unterdrückbar durch alkalische Salze, weil diese als solche bereits haemolysierend wirken durch die OH-Ionen. Ammoniumchlorid hatte in keinem Falle eine haemolytisch hemmende Wirkung. Es wurde der Versuch auch mit stärkeren Konzentrationen bis zu einer Gefrierpunktserniedrigung von 2° verfolgt, ohne daß sich eine Hemmung zeigte. Dies ist auch ohne weiteres verständlich; denn, wie M. H. Jakobs gezeigt hat, haben die NH_3 und NH_4R-Moleküle eine ganz spezielle Wirkung auf die Blutkörperchen als Komplexe. Sie dringen in diese ein und zerstören durch nachfolgende Dissociation im Innern der Erythrozyten das Donnan-Gleichgewicht und bringen damit die Blutkörperchen zum Platzen.

Die Neutralsalze haben alle eine bei ungefähr dem gleichen osmotischen Druck liegende Hemmungsgrenze. Magnesiumchlorid macht in dieser Reihe keine Ausnahme. Das steht zwar im Widerspruch zu Angaben aus der Literatur. Wiederholte Versuche ergaben aber immer wieder das gleiche Resultat.

Anders verhalten sich die sauren Salze, die eine stark hemmende Wirkung auf die Haemolyse haben, diese ist durch eine Ueberlagerung des H^+-Jons bedingt. Sie wirken vor allem in schwächeren Konzentrationen.

Ausgesprochen hemmend zeigt sich das Calciumchlorid selbst in isotonischen Lösungen. Bei einem Gemisch von 0,9 ccm Serum und 0,1 ccm Erythrozyten, 2,4 ccm Calciumchlorid + 0,6 ccm Ringer trat bereits keine Haemolyse auf, sogar nach tagelangem Stehen wurde sie nicht beobachtet. Der Versuch zeigte auch bei 0,4 ccm $CaCl_2$ eine deutliche Verzögerung. Der Gedanke war berechtigt, daß möglicherweise das Calciumchlorid mit dem Haemolysin eine enge Verbindung im Sinne einer Fällung eingehe; dadurch würde das Ferment ausgeschaltet. Eine einfache Versuchsanordnung sollte diese Fragestellung klären. In Vorversuchen wird die Fällungsgrenze von $CaCl_2$ in den üblichen Serum-Erythrozyten-Gemischen festgestellt und dabei der Wert von 0,4 ccm einer isotonischen Lösung gefunden. Es werden nun 10 ccm Schweineserum mit 20 ccm isotonischer $CaCl_2$-Lösung versetzt. Nach kurzem Stehenlassen wird ausgiebig zentrifugiert. Am Boden zeigt sich ein weißlicher Niederschlag. — Von dem Ueberstand werden 3 ccm mit 10; 12; 14 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt und 0,1 ccm Erythrozyten zugefügt. Nach drei Stunden im Brutschrank bei 37° zeigte sich in allen drei Röhrchen eine Haemolyse. Damit ist erwiesen, daß das Haemolysin nicht, oder jedenfalls nicht vollständig in den Bodensatz gegangen ist, und daß eine Reversion der Hemmung durch Verdünnung der $CaCl_2$-Konzentration ohne weiteres möglich ist. Der Rückstand wird mit isotonischer Calciumchloridlösung gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abgießen des Ueberstandes in physiologische Kochsalslösung aufgenommen. Die hernach zugesetzten 0,2 ccm Erythrozyten werden nicht haemolysiert. Also ist in dem fraglichen Niederschlag kein Haemolysin in abspaltbarer Form enthalten. Die Hemmung muß also auch hier im Sinne einer Viskositätserhöhung durch das Calciumchlorid wirken.

Die Frage war nun noch zu entscheiden, ob der osmotische Druck alleinige Ursache der Unterdrückung der Haemolyse ist. Zu diesem Zwecke wird die Gefrierpunktserniedrigung einer 1,7 % Kochsalzlösung bestimmt und durch Interpolation 1,02° ermittelt. Rechnerisch wird nun gefunden, daß eine rund 20 % Rohrzuckerlösung den gleichen Gefrierpunkt von 1,02° hat. Mit einer 24 % Rohrzuckerlösung wird also der folgende Versuch angestellt, wobei die Erythrozyten erst nach gründlichem Durchschütteln der anderen Teile zugesetzt werden.

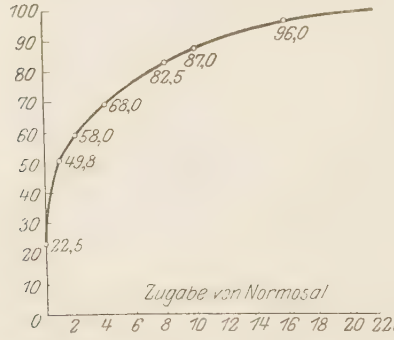
1.	2,0	Rohrzucker	0,0	H_2O	0,9	Serum	0,1 Erythroz.
2.	1,8	„	0,2	„	0,9	„	0,1 „
3.	1,6	„	0,4	„	0,9	„	0,1 „

4.	1,4	Rohrzucker	0,6	H_2O	0,9	Serum	0,1 Erythroz.
5.	1,2	„	0,8	„	0,9	„	0,1 „
6.	1,0	„	1,0	„	0,9	„	0,1 „

In allen Röhren ist eine ausgesprochene Haemolyse sichtbar. Damit scheint also eine spezifische Satzwirkung vorhanden zu sein, wenn man wohl auch an eine ausschlaggebende Beteiligung des osmotischen Druckes denken muß. Wie oben erwähnt, glaubt ja Eisler in der Erhöhung der Viskosität, die durch Salze hervorgerufen wird, den hemmenden Einfluß zu erblicken. Im Zusammenhang mit den bekannten Entmischungen von Cholesterin-Lecithin-Systemen in den Erythrozytenmembranen scheint auch diese Beziehung sehr wichtig zu sein.

Zum Schluß soll noch untersucht werden, ob die Haemolyse durch eine Verdünnung des Serums beeinflußt wird. Henri behauptet, bei seinen Versuchen beobachtet zu haben, daß der Blutaustritt bei der Verdünnung des Serum-Erythrozyten-Gemisches verzögert ist. Ein entgegengesetztes Resultat führen Mioni und auch Londoner Versuche an.

Es werden Serumverdünnungen mit Normosal hergestellt und Blutkörperchen zugesetzt. Dabei zeigte sich interessanterweise, daß die Reaktion bedeutend früher beendet war und auch vollständiger verlief; das heißt, daß der Endpunkt höher lag, als bei dem üblichen Kurvenverlauf. Die Kurve, die nachstehend angeführt werden soll, zeigt einen eigenartigen Verlauf. Sie entspricht vollständig einer Parabel.



Dieser Vorgang deckt sich ungefähr mit der Beobachtung, daß man haemolytische Gemische, die bereits in ihrem Ablauf stehen geblieben sind, durch Verdünnung mit Salzlösungen zum Fortschreiten bringen kann. Diese Tatsache spricht eindeutig gegen die Absättigung des Haemolysins, wie sie häufig in der Literatur vertreten ist, und läßt eher an einen Adsorptionsvorgang — wie oben erwähnt — denken.

Die vorliegenden Versuche können vielleicht eine Anregung geben, die in vitro gemachten Erfahrungen in vivo nachzuprüfen und dadurch in der Klinik eine sehr erwünschte Verwertung bekommen. Ich bin mir voll bewußt, daß im tierischen Organismus vollständig andere Bedingungen sind, und daß die Versuche gänzlich andere Resultate ergeben können. Aber schließlich besteht doch die Möglichkeit, daß sich in dem komplizierten kolloidalen Milieu, in dem der Prozeß abläuft, die hemmende Wirkung des einen oder anderen Faktors addiert.

Zusammenfassung.

Die Zusammenfassung der vorliegenden Versuche ergibt folgendes Resultat:

1. Beim Zusatz von steigenden Erythrozytenmengen zum Serum zeigt sich bei geringen Blutkörperchenmengen eine vollständige Haemolyse, diese nimmt bei erhöhten Erythrozyten-Konzentrationen steigend ab. Die bei diesen Versuchen rechnerisch gewonnenen Haemoglobinwerte ergaben eine typische Adsorptionskurve.

2. Der Erythrozytenrückstand eines beendeten Versuchs zeigt keine Resistenzverminderung der Blutkörperchen bei Wiederholung des Haemolyseversuches mit frischem Serum.

3. Der Zusatz von Haemoglobin hat keinen Einfluß auf den Ablauf der Haemolyse; dieser Körper kann daher nicht der hemmende Faktor sein.

4. Arteigenes Serum unterdrückt vollständig die Haemolyse, sogar in geringen Zusätzen von 0,5 ccm.

5. Lecithinsol, Cholesterinsol und Helpin bewirken eine deutliche Verzögerung im Ablauf der Reaktion.

6. Eine noch ausgesprochenere Wirkung haben die Stromata-Extrakte, die durch Aetherextraktion gewonnen werden. Sie erzeugen eine deutliche Hemmung der Haemolyse.

7. Die Haemolyse ist nicht unterdrückbar durch alkalische Salze, da die OH-Jonen als solche haemolytisch wirken, desgleichen Ammoniumchlorid, da NH_3 und NH_4R-Moleküle — wie Jakobs gezeigt hat — innerhalb der Blutkörperchen dissoziieren und damit die Hülle sprengen.

8. Neutralsalze haben eine bei dem gleichen osmotischen Druck liegende Hemmungsgrenze.

9. Die sauren Salze hemmen durch eine Ueberlagerung des H^+-Jons. Calciumchlorid verhindert den Blutaustritt selbst in isotonischen Lösungen. Bereits bei 0,4 ccm $CaCl_2$ ist eine auffällige Verzögerung zu bemerken.

10. Diese Hemmung beruht nicht, wie durch Versuche nachgewiesen werden konnte, auf einer Ausfällung des Haemolysins durch $CaCl_2$, sondern wahrscheinlich auf einer Viskositätserhöhung, die durch das Calciumchlorid bedingt ist.

11. Eine 24% Rohrzuckerlösung, die die gleiche Gefrierpunktserniedrigung von 1,02° hat wie eine hemmende 1,7% Kochsalzlösung, unterdrückt die Haemolyse nicht. Mithin ist der osmotische Druck nicht alleinige Ursache der Hemmung.

12. Bei starken Serumverdünnungen mit Normosal findet ein schnellerer und vollständigerer Verlauf der Reaktion statt.

Literaturverzeichnis.

1.	Zeitschrift für Hygiene	2	159	1909
2.	Biochemische Zeitschrift	146	212	1924
3.	Zeitschrift für klinische Medizin	96	383	1923
4.	Journal of phys.	59	48	1924
5.	Americ. journ. of. phys.	68	585	1924
	„ „ „ „	68	146	1924
6.	Kliwo	3	1614	1924
7.	Proc. of the Roy. soc. of London	95	382	1923
8.	Archiv für experim. Path. und Pharmak.	62	1	1923
9.	Soc. de biol.	91	1014	1924
10.	„ „ „	56	121 ff	1905
11.	„ „ „	56	192	
12.	„ „ „	57	507	1906
13.	Journal of laborat. a. clin. med. Bd. 10. Nr. I.		19	1924
14.	Soc. de biol.	56	855 ff	1905
15.	„ „ „	56	589	
16.	„ „ „	56	28	1905
17.	„ „ „	56	35	1905
18.	„ „ „ Ruffer	79		1906
19.	„ „ „		635	1905
20.	Biochemische Zeitschrift	45	119	
21.	Journ. exper. medic.	IX.	436	1902
22.	Münchener medizinische Wochenchrift (von Dungem)	14		1908
23.	Berliner Kliwo		348	1908
24.	cit. nach Weichardt			
25.	Biochem. Zeitschrift	147	557	1924
26.	Zeitschrift für allgem. Path. u. path. Anat.	33	1—8	1923
27.	Zeitschrift für Immunitätsforschung	36	356	1923
28.	Ergebnisse d. Phys.	VII.	553	1908
29.	Biochemische Zeitschrift	83	379	
30.	Soc. de Biol.	60	571	
31.	Biochemische Zeitschrift	155	250	
32.	Ergebnisse d. Physiol.	X.	311	
33.	Cpts. rend . . . de biol.	89	225	1923

Die Kurven sind mit Genehmigung aus der gemeinsamen Arbeit Dr. Klinke, Knauer, Kramer entnommen über Haemolysestudium, Zeitschrift für experim. Mediz. 1926.

Lebenslauf.

Ich, Barbara Kramer, evangelisch, bin am 4. Dezember 1896 zu Beuthen Oberschlesien geboren, als Tochter des verstorbenen Landgerichtsrat Viktor Kramer und seiner Ehefrau Adelheid, geb. Sethe. Ich besuchte in Beuthen das Lyzeum und trat 1919 nach privater Vorbereitung in die Oberprima der städtischen Oberrealschule ein, wo ich Ostern 1920 das Abiturient-Examen bestand. Darauf bezog ich die Universität München und machte im Sommer 1922 die ärztliche Vorprüfung. Nach zwei weiteren Semestern in München ging ich an die Universität Breslau, an der ich nach dem zehnten Semester das ärztliche Staatsexamen ablegte. Am 1. Juli 1925 begann ich das Medizin. Praktikanten-Jahr in der Chirurgischen Universitäts-Klinik Breslau. Nach drei Monaten, am 1. Oktober 1925, ging ich zur weiteren Ausbildung bis zum 1. Juli 1926 an die Universitäts-Kinderklinik. Ich besitze die preußische Staatsangehörigkeit.

Barbara Kramer.